

学校编码: 10384

分类号__密级

学 号: 20620101151503

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

应用蛋白质组学解析红发夫酵母合成虾青素的碳氮源调控分子机制

Regulation Mechanism of the Carbon and Nitrogen on
Astaxanthin Synthesis in *Phaffia rhodozyma* by Proteomics

潘 雪 珊

指导教师姓名: 卢英华教授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2013 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要	I
第一章 文献综述	1
1.1 虾青素简介	1
1.1.1 虾青素的理化性质	1
1.1.2 虾青素的生理功能	2
1.1.3 虾青素的生物安全性	4
1.1.4 虾青素的应用及前景	4
1.2 虾青素的来源	5
1.2.1 化学合成虾青素	5
1.2.2 甲壳类动物提取	5
1.2.3 生物合成	6
1.3 红发夫酵母与虾青素	7
1.3.1 红发夫酵母简介	7
1.3.2 红发夫酵母中虾青素的生物合成途径	8
1.3.3 红发夫酵母虾青素生物合成中的相关酶	9
1.3.4 红发夫酵母生产虾青素研究进展	12
1.3.5 红发夫酵母对氮源吸收的调控	13
1.4 蛋白质组学研究进展	16
1.4.1 蛋白质组学简介	16
1.4.2 蛋白质组学的研究进展	18
1.5 本论文研究内容及意义	20
第二章 氮源种类及浓度优化	21
2.1 材料与方法	21
2.1.1 实验材料	21
2.1.2 培养方法	22

2.1.3 实验分析方法	23
2.2 结果与讨论	25
2.2.1 氮源种类优化	25
2.2.2 氮源浓度优化	27
2.2.3 碳氮比的优化	29
2.3 本章小结	31
第三章 氮源调控对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响	33
3.1 材料与方法	33
3.1.1 实验材料	33
3.1.2 培养方法	34
3.1.3 实验分析方法	34
3.2 结果与讨论	36
3.2.1 批次发酵	36
3.2.2 补加无机氮源硫酸铵对虾青素合成的影响	37
3.2.3 补加有机氮源谷氨酸对虾青素合成的影响	41
3.2.4 补加无机氮源和有机氮源对虾青素合成的比较	44
3.3 本章小结	45
第四章 红发夫酵母合成虾青素的蛋白质组学分析	46
4.1 材料与方法	46
4.1.1 实验材料	46
4.1.2 试剂与仪器	46
4.1.3 实验方法	46
4.2 结果与讨论	60
4.2.1 细胞蛋白提取条件的优化	60
4.2.2 菌体生长期与虾青素合成期蛋白调控的研究	62
4.2.3 24 h 补加硫酸铵对红发夫酵母胞内蛋白表达调控的研究	70
4.2.4 24 h 补加谷氨酸对红发夫酵母胞内蛋白表达调控的研究	78
4.2.5 葡萄糖浓度对红发夫酵母胞内蛋白表达调控的研究	84

4.3 本章小结	90
第五章 结论及展望	93
5.1 结论	93
5.2 展望	94
参 考 文 献	95
附 录	108
在读期间发表论文	112
致 谢	113

CONTENTS

Abstract

摘要	III
ABSTRACT	I
第一章 文献综述	1
1.1 虾青素简介	1
1.1.1 虾青素的理化性质 ^[2-4]	1
1.1.2 虾青素的生理功能	2
1.1.3 虾青素的生物安全性	4
1.1.4 虾青素的应用及前景	4
1.2 虾青素的来源	5
1.2.1 化学合成虾青素	5
1.2.2 甲壳类动物提取	5
1.2.3 生物合成	6
1.3 红发夫酵母与虾青素	7
1.3.1 红发夫酵母简介	7
1.3.2 红发夫酵母中虾青素的生物合成途径	8
1.3.3 红发夫酵母虾青素生物合成中的相关酶	9
1.3.4 红发夫酵母生产虾青素研究进展	12
1.3.5 红发夫酵母对氮源吸收的调控	13
1.4 蛋白质组学研究进展	16
1.4.1 蛋白质组学简介	16
1.4.2 蛋白质组学的研究进展	18
1.5 本论文研究内容及意义	20
第二章 氮源种类及浓度优化	21
2.1 材料与方法	21

2.1.1 实验材料	21
2.1.2 培养方法	22
2.1.3 实验分析方法	23
2.2 结果与讨论	25
2.2.1 氮源种类优化	25
2.2.2 氮源浓度优化	27
2.2.3 碳氮比的优化	29
2.3 本章小结	31
第三章 氮源调控对红发夫酵母生长及虾青素积累的影响	33
3.1 材料与方法	33
3.1.1 实验材料	33
3.1.2 培养方法(同 2.1.2)	34
3.1.3 实验分析方法	34
3.2 结果与讨论	36
3.2.1 批次发酵	36
3.2.2 补加无机氮源硫酸铵对虾青素合成的影响	37
3.2.3 补加有机氮源谷氨酸对虾青素合成的影响	41
3.2.4 补加无机氮源和有机氮源对虾青素合成的比较	44
3.3 本章小结	45
第四章 红发夫酵母合成虾青素的蛋白质组学分析	46
4.1 材料与方法	46
4.1.1 实验材料(同 2.1.1 及 3.1.1)	46
4.1.2 试剂与仪器	46
4.1.3 实验方法	46
4.2 结果与讨论	60
4.2.1 细胞蛋白提取条件的优化	60
4.2.2 菌体生长期与虾青素合成期蛋白调控的研究	62
4.2.3 24 h 补加硫酸铵对红发夫酵母胞内蛋白表达调控的研究	70

4.2.4 24 h 补加谷氨酸对红发夫酵母胞内蛋白表达调控的研究	78
4.2.5 葡萄糖浓度对红发夫酵母胞内蛋白表达调控的研究	84
4.3 本章小结	90
第五章 结论及展望	93
5.1 结论	93
5.2 展望	94
参考文献	95
附录	108
在读期间发表论文	112
致谢	113

摘要

随着人类对天然虾青素需求的不断扩大,红发夫酵母以其易于培养的优点被选作当前虾青素生产极具潜力的微生物。过去研究发现培养基中氮源对红发夫酵母虾青素合成有明显的影响,低氮能够促进红发夫酵母合成虾青素。因此,本论文研究了碳氮源对红发夫酵母生长及虾青素产量的影响,继而采用蛋白质组学技术研究在碳氮源调控下红发夫酵母细胞表达的差异蛋白,筛选出响应碳氮源的关键蛋白质,并从分子水平上初步探索碳氮源调控机制。

首先,本论文在对碳氮比优化时发现初始葡萄糖浓度对红发夫酵母中虾青素的积累有很大的影响,在氮源浓度一定的条件下,高浓度葡萄糖可促进红发夫酵母生物量的积累及虾青素产量的提高,但虾青素的比产率却较低浓度葡萄糖低,结果表明初始碳浓度显著影响菌体生长及代谢物积累,低碳可促进虾青素的生物合成过程。

本论文同时考察了在红发夫酵母生长过程中补加氮源对细胞生长及虾青素合成的影响。实验结果表明补加不同种类的氮源及不同的浓度对菌体生物量以及虾青素的产量有着不同的影响,在合适的时间点补加适量的氮源能明显促进虾青素的积累。根据实验结果,研究确定了最适的补氮时间为 24 h,最适的补

加氮源为谷氨酸，最适的补加浓度为 0.368 g/L，在此补加条件下，虾青素的最大产量和产率分别为 3.445 mg/L 和 1.144 mg/g，较对照组分别提高了 36%和 41%，这说明在细胞生长过程中补氮有利于虾青素的积累，这为进一步阐明红发夫酵母合成虾青素的氮源调控网络奠定了基础。

最后，本论文运用蛋白质组学技术，分析了对数生长期及稳定期菌体蛋白质组的差异表达，结果发现 31 个蛋白差异表达。同时还分析了碳氮源调控下菌体合成虾青素过程中的差异蛋白表达情况，包括不同糖浓度条件及不同补氮条件下菌体内的差异蛋白质。结果筛选出的差异蛋白的功能涉及细胞过程(转运蛋白)、环境过程(信号转导)、遗传信息过程、细胞代谢过程(糖代谢、脂代谢、次级代谢物代谢、氧化应激代谢及氨基酸代谢)等多个方面，该结果可为今后深入研究红发夫酵母的碳氮源调控网络提供一定的科学依据。

关键词：红发夫酵母；虾青素；碳氮源调控；蛋白质组学

Abstract

With the increasing demand of human beings for natural astaxanthin, *Phaffia rhodozyma* which was easily cultured was chosen as the most potential production microorganism. The initial nitrogen source remarkably affected astaxanthin biosynthesis in *P. rhodozyma*. Low nitrogen content also promoted the biosynthesis of astaxanthin of *P. rhodozyma*. Therefore, this study aimed to reveal the differentially expressed proteins in *P. rhodozyma* cells using proteomic approaches to decipher the effects of carbon and nitrogen regulation on *P. rhodozyma*. As a result, we hope to discover the key proteins in response to such regulations, and further investigate the molecular mechanisms of carbon and nitrogen source regulation in *P. rhodozyma*.

In this study, the effect of the glucose concentration on the growth of *P. rhodozyma* at a fixed nitrogen concentration was firstly investigated. The results showed that the biomass and astaxanthin production were enhanced by an initial high glucose concentration presented in the medium. However, astaxanthin content was inhibited by a high glucose concentration. The result showed that the initial carbon concentration remarkably affected astaxanthin biosynthesis in *P. rhodozyma*. Lower carbon concentration promoted the biosynthesis of astaxanthin in *P. rhodozyma*.

At the same time, the effect of nitrogen feeding on astaxanthin biosynthesis in *P. rhodozyma* during the process of cell growing was investigated in this work. Furthermore, optimal source and concentration of nitrogen for astaxanthin production were also investigated. As a result, the optimal nitrogen source, concentration and feeding time were glutamate of 0.368 g/L at 24h, respectively. The highest astaxanthin yield of 3.445 mg/L and the maximum astaxanthin productivity of 1.144 mg/g were achieved for which were 36% and 41% higher than the original conditions. It indicated that nitrogen feeding was beneficial to improve astaxanthin accumulation. Simultaneously, the elucidation of the nitrogen regulation mechanism of astaxanthin synthesis can be further discussed.

One way to obtain an integrated view of a response pathway at different cell growth phases was to use global methods such as proteomics. Therefore, proteomics approach was firstly applied to analyze the differentially expressed proteins in *P. rhodozyma* cell at different cell growing phases. 31 proteins were found to be differentially expressed. It's also demonstrated that proteomics level changes were

involved in carbon and nitrogen source regulation of astaxanthin biosynthesis in *P. rhodozyma*. As the result, these distinct proteins were included of cellular processes (i.e. transport and motor) proteins, environmental information processing (i.e. signal transduction) proteins, genetic information processing and cell metabolism process (i.e. carbohydrate metabolism, lipid metabolism, secondary metabolite/ carotenoid biosynthesis, redox metabolism and amino acid metabolism) proteins.

Key words: *P. rhodozyma*; astaxanthin; carbon and nitrogen regulation; proteomics

第一章 文献综述

1.1 虾青素简介

虾青素是类胡萝卜素的一种，类胡萝卜素呈黄色、橙红色或红色，在自然界中扮演着极其重要的角色，其参与组成色彩缤纷的大千世界(图1.1A)，反之我们的世界将如同图B一样没有色彩。目前，类胡萝卜素有600多种^[1]。每年天然产生的类胡萝卜素达1亿吨，主要应用于食品、医药、化工、保健、饲料和化妆品等工业。



图 1.1 公园中的花草植物(左图)，同一场景的黑白色(右图)

Fig.1.1 The flowers at a garden (left). The same scene in black and white (right)

1.1.1 虾青素的理化性质^[2-4]

虾青素(astaxanthin)又名虾黄素，化学名为3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基- β , β' -胡萝卜素(3, 3'-dihydroxy -4, 4'-dione- β , β' -carotene)，分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$ ，相对分子量为596.86，其结构式见图1.2。虾青素属叶黄素族，广泛存在于生物界中，特别是存在于甲壳纲动物、鱼类及鸟类中，是它们的主要色素。其晶体呈深紫褐色，在体内可与蛋白质结合成青蓝色，熔点约为224℃，易于氧化成虾红素，不溶于水，易溶于大部分有机溶剂，如二甲亚砜、丙酮、三氯甲烷等，所以常用有机溶剂萃取提纯。

虾青素化学结构是由四个异戊二烯单位以共轭双键形式连接，同时两端分别有一个由异戊二烯单位形成的六环结构。六环结构的C-3和C-3'位置上为手性中心，这两个手性碳原子能以R或S存在，故存在四种构象，即一对对映体的异构体(3S, 3'S; 3R, 3'R)和内消旋形式(3S, 3'R; 3'S, 3R)。1974年，Andrewes等^[3]鉴定磷虾卵和雨生红球藻中虾青素的构象为(3S, 3'S)。Renstrom等^[5]对由(4R, 6R)-4-羟基-2, 2, 2-三甲酰

环己酮合成的虾青素进行X-衍射分析, 结果表明(3S, 3'S)构象是磷虾和雨生红球藻中虾青素最主要的构象。后来Andrewes等人^[6]分析了红发夫酵母中虾青素的构象, 发现92%的异构体为(3R, 3'R)。虾青素的立体异构体如图1.3所示。

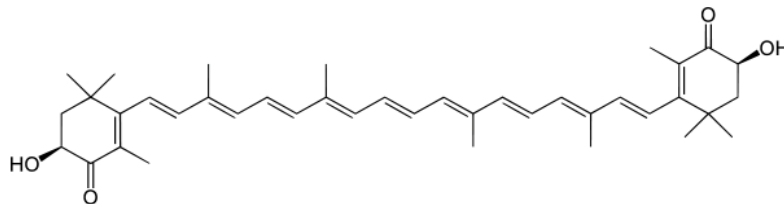


图 1.2 虾青素的分子结构

Fig.1.2 Molecular structure of astaxanthin

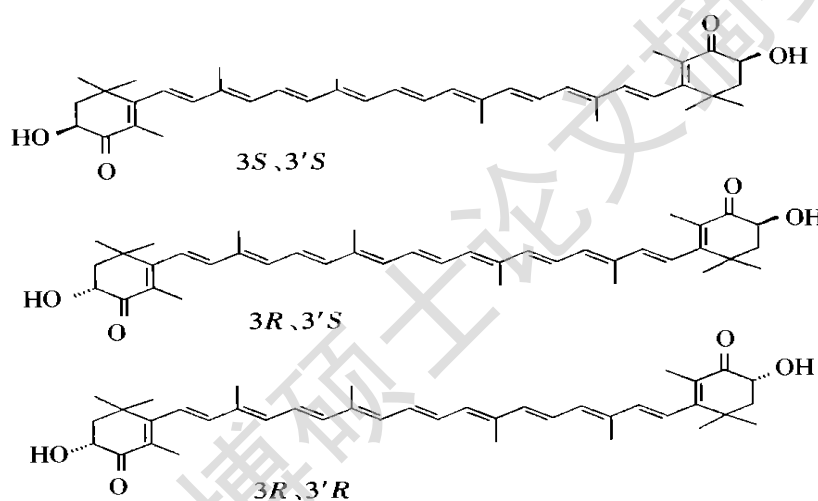


图 1.3 虾青素立体异构体

Fig.1.3 The stereomerides of astaxanthin

化学合成的虾青素都为游离虾青素, 立体异构体的比例约为 $n(3S, 3'S): n(3S, 3'R): n(3R, 3'R)=1:2:3$ 。天然虾青素则主要以(3S, 3'S)和(3R, 3'R)两种形式存在, 且往往与蛋白质形成复合物^[7], 或与脂肪酸结合形成酯。虾青素在细胞内很少以游离的形式存在, 游离的虾青素不稳定。

1.1.2 虾青素的生理功能

1.1.2.1 虾青素的着色作用

虾青素是鸟类、鱼类及虾蟹的重要组成成分, 呈艳丽的红色, 具有极强的色素沉积能力。它进入动物体以后可以不经任何修饰或生化转化而直接贮存在组织中

[8], 使一些水生动物的皮肤和肌肉及禽类的羽毛等表现出健康而鲜艳的颜色。研究表明, 虾青素是最为有效的着色剂[9]。余俊欣等[10]在实验中发现, 通过向幼虾饲料中添加40 mg/100 g虾青素, 连续投喂4周, 即能达到增色的效果。此外在观赏鱼(珍珠马丽鱼、红剑尾鱼等)饲料中添加虾青素, 能使其体色更加艳丽, 提高观赏价值。

1.1.2.2 虾青素增强机体免疫力的活性

虾青素能有效提高动物体的免疫能力, 抗机体炎症。Jyonouchi^[11]等研究表明虾青素能显著促进胸腺依赖抗原刺激时的抗体产生, 提高动物机体免疫力。资料表明, 抗原存在时, 虾青素能明显促进脾细胞产生抗体, 增强T细胞刺激人体白细胞免疫球蛋白的产生^[12]。Odai和Higashi^[13]通过体外细胞培养试验证明: 虾青素对增强鼠免疫活性细胞的增殖及其他功能方面具有免疫调节活性。Jyonouchi^[14]及Bendich^[15]等人的研究表明虾青素能提高人体免疫球蛋白的产生。

1.1.2.3 虾青素的抗氧化活性

虾青素同其他类胡萝卜素一样具有抗氧化活性, 主要表现为淬灭单线态氧^[16], 清除自由基, 阻止脂质过氧化等功能^[17, 18]。许多研究表明虾青素的抗氧化性能远强于 β -胡萝卜素、玉米黄质、角黄质、维生素C和维生素E等^[19-21], 素有“超级维生素E”之称。类胡萝卜素抗氧化顺序为: 虾青素> β -胡萝卜素> γ -胡萝卜素>玉米黄质>黄体素>胆红素>胆绿素^[21]。MIKI等^[22]用硫代巴比妥酸法检测几种类胡萝卜素、 α -生育酚(维生素E)清除自由基的半数效应剂量(ED₅₀)(见表1.1), 结果表明, 虾青素抗脂肪氧化的能力最强, 较 β -胡萝卜素高10倍, 较维生素E高550倍。

表1.1 几种类胡萝卜素的ED₅₀

Tab.1.1 ED₅₀ of several carotenoids

类胡萝卜素	ED ₅₀ (nmol/L)	类胡萝卜素	ED ₅₀ (nmol/L)
虾青素	200	金枪鱼黄素	780
玉米黄素	400	β -胡萝卜素	960
角质素	450	维生素E	2940
叶黄素	700		

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库